

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**BIANCA THAÍS DE LIMA**

**Obtenção de perfil genético de lâminas de testes confirmatórios para presença de espermatozoides e seu auxílio na identificação de agressores sexuais**

**CURITIBA  
2016**

**BIANCA THAÍS DE LIMA**

**Obtenção de perfil genético de lâminas de testes confirmatórios para presença de espermatozoides e seu auxílio na identificação de agressores sexuais**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Malheiros  
Ferreira

Co-Orientadora: Marianna Maia Taulois do  
Rosário

**CURITIBA  
2016**

## **AGRADECIMENTOS**

Os agradecimentos vão primeiramente aos meus pais, Luciane e Maurício, por todo o suporte em todos estes anos, não apenas na universidade e na construção deste trabalho, mas em toda minha vida. Muito obrigado por todo o amor, apoio e excelente exemplo que me proporcionam, amo vocês. Ao meu irmão e a toda a minha família.

A Eduarda, minha parceira e amiga nesses nossos 8 anos (e muitos mais), sempre presente, sempre ao meu lado não importa a situação. Assim como para meus pais, este é apenas um simples agradecimento, pois o meu amor por vocês é inexplicável, imensurável.

Aos amigos, conquistados durante o curso, os quais são de extrema importância para mim, levo-os comigo para vida, Saritha, que me deu a enorme alegria de ser madrinha da Julinha, Alini, Bárbara, Henrique e Rafael, assim como os demais colegas que participaram desta caminhada.

A Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de fazer parte desta instituição, de ter completado este curso de graduação, onde obtive experiências inigualáveis, o qual é minha paixão, e que me proporcionou o amadurecimento e crescimento necessários.

A minha orientadora, Dra Danielle Malheiros pela dedicação e esforços direcionados a este trabalho, por todas as correções e conselhos de foram essenciais para os resultados aqui obtidos.

A equipe do laboratório de bioquímica forense do Paraná, especialmente as peritas Luciellen, Ana, Camila, Josi, Paula e Jaqueline, pela grande ajuda e prestatividade ao ceder seu tempo e suas amostras a este trabalho, sem elas isto não seria possível.

A equipe do laboratório de genética molecular forense, a todos os peritos e técnicos, Emerson, Cláudia, Cris, Carlos, Léo, Marcelo pela grande chance de experiência de vida, de mercado de trabalho e de aprendizado que tive ao estagiar no laboratório, agradeço em especial a minha co-orientadora Dra Marianna Maia, que além de ser uma grande mestre, de ter me oferecido a oportunidade para a realização deste trabalho, é uma grande amiga, pois atravessando os limites do laboratório, e além do fato de que sem ela, esses resultados não seriam possíveis, ela é capaz de ver e mostrar meu potencial, de ser um exemplo incrível.

A todos, o meu muito obrigada.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletroferograma mostrando um perfil único masculino obtido da amostra teste Vários FF 1:20.....	19
Figura 2. Eletroferograma mostrando um perfil único masculino obtido da amostra teste Moderados FM 1:20.....	22
Figura 3. Eletroferograma mostrando um perfil único masculino obtido da amostra teste Vários FF 1:10.....	23
Figura 4. Eletroferograma mostrando um perfil parcial único masculino obtido da amostra Raros 2FM.....	24
Figura 5. Eletroferograma mostrando um perfil completo único masculino obtido da amostra Raros 53FM.....	25
Figura 6. Eletroferograma mostrando um perfil completo de mistura mostrando a presença de pelo menos dois indivíduos, sendo um deles do sexo masculino, obtido da amostra moderados 55FM.....	26
Figura 7. Eletroferograma mostrando um perfil completo único masculino obtido da amostra Moderados 20FM.....	27
Figura 8. Eletroferograma mostrando um perfil único masculino completo obtido da amostra Vários 9FM.....	27
Figura 9. Eletroferograma mostrando um perfil de mistura com pelo menos dois indivíduos do sexo masculino obtido da amostra Vários 25FM. No destaque, o controle interno DY5391.....	28

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Programa de ciclagem térmica para o <i>kit Plexor® HY System</i> utilizado na PCR <i>real time</i> .....	15
Quadro 2. Programa de ciclagem térmica para o <i>kit PowerPlex® Fusion system</i> .....	16
Quadro 3. Diluições utilizadas para produzir as lâminas que simulam diferentes quantidades de espermatozoides encontradas nas lâminas de testes confirmatórios para presença de espermatozoides.....	17
Quadro 4. Resultado da quantificação e da análise de tamanho dos fragmentos de DNA extraído das amostras teste de lâminas com diferentes quantidades de espermatozoides.....	18
Quadro 5. Resultados da quantificação e análise de tamanho dos fragmentos de DNA extraído a partir de amostras de casos reais.....	21

## RESUMO

Crimes sexuais ocorrem em frequências alarmantes e a obtenção de material biológico proveniente do agressor e que permita sua identificação através de perfil genético é de suma importância. Desta forma, com a intenção de proporcionar um aumento do número de casos solucionados, este trabalho tem o objetivo de obter perfil genético proveniente de lâminas de testes confirmatórios para a presença de espermatozoides. Para tanto, no início deste trabalho foram produzidas lâminas que simulam aquelas com diferentes quantidades de espermatozoides a fim de padronizar os procedimentos de lavagem de lâminas a fresco, extração de DNA, quantificação e amplificação de DNA para obtenção de perfil genético. Os testes iniciais foram realizados com 12 amostras de diluições diversas de sêmen, com a intenção de simular os casos de rotina do Laboratório de Bioquímica Forense e padronizar os demais procedimentos a serem realizados. Após os testes, foram coletadas 115 amostras de casos reais da rotina dos Laboratórios de Bioquímica Forense e Genética Molecular Forense da polícia científica do estado do Paraná, as quais foram submetidas aos mesmos procedimentos que as amostras teste. Ao fim da análise de fragmentos, foi constatada a obtenção de perfis genéticos em 6 das 12 amostras teste analisadas e de 88 das 115 amostras reais. Além disso, das 88 amostras que resultaram em obtenção de perfil genético, 32 indicaram a presença de material genético masculino, demonstrando a eficácia do protocolo de lavagem de lâminas de testes confirmatórios para presença de espermatozoide a fresco, desenvolvido neste projeto. Sendo assim, foi verificado que é possível ampliar o potencial de recuperação de perfis genéticos em casos de crimes sexuais, acrescentando o protocolo aqui descrito na rotina dos laboratórios de genética forense.

## ABSTRACT

Sex crimes occur in an alarming rate and obtaining biological material from perpetrators that allows identification through genetic profiling is extremely important. Thus, with the intention of providing an increase in solved sex crime cases this study intends to obtain genetic profile from material collected from glass slides confirmatory tests for the presence of spermatozoa. Therefore, at the beginning of this study, glass slides containing different quantities of spermatoc material were produced aiming to simulate results obtained at the forensic biochemistry laboratory, in order to standardize the following procedures: glass slides washing, DNA extraction, quantification and amplification. Afterwards, 115 samples from real sex crimes cases were collected and subjected to the same procedures as the test samples. At the end of the fragment length analysis procedure, 6 out of 12 test samples provided genetic profile, besides, 88 out of 115 real cases samples also shown positive results and 32 samples indicated the presence of male genetic material. Those results show the efficacy of the glass

slide washing protocol developed in this study. Thereby, is here demonstrated a new method to recover genetic profile in sex crimes cases that could be added in forensic laboratories routine.

## SUMÁRIO

<a href="#">1</a> INTRODUÇÃO .....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
2.1 Violência sexual, crime no contexto nacional e internacional.....	10
2.2 Atendimento e Coleta de Material .....	10
2.3 Processamento das Amostras .....	11
2.4 Genética forense .....	12
3 OBJETIVOS .....	13
3.1 Objetivo geral .....	13
3.2 Objetivos específicos .....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1 Preparo das lâminas .....	13
4.2 Lavagem de lâminas .....	14
4.3 Extração de DNA .....	14
4.4 Quantificação do DNA.....	15
4.5 Amplificação do DNA .....	16
4.6 Análise de tamanho de fragmentos.....	16
5 RESULTADOS .....	17
6 DISCUSSÃO .....	22
7 CONCLUSÃO.....	29
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
ANEXO A - Crimes violentos no estado do Paraná.....	33
ANEXO B - Resultados da quantificação e análise de tamanho dos fragmentos para as amostras de casos reais.....	34



## 1. INTRODUÇÃO

Os casos de crimes sexuais estão entre os mais ocorrentes no Estado do Paraná. Segundo dados da Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP) foram registrados cerca de 3.913 casos nas delegacias da Polícia Civil do Estado, no ano de 2014 (Anexo A). Os dados somam todas as denúncias consideradas como estupro, definido como o ato de “constranger alguém, mediante violência ou grave ameaça, a ter conjunção carnal ou a praticar ou permitir que com ele se pratique outro ato libidinoso” (SINESP, 2015). Em 2014, os crimes sexuais representaram 73% dos crimes violentos no estado do Paraná. Por ser um crime geralmente não testemunhado, para que haja a comprovação do delito as evidências mais importantes são as coletadas do corpo, vestes e objetos das vítimas, que possivelmente contenham material biológico provenientes do autor do crime (Montoya et.al.; 2011).

Em Curitiba, o atendimento a vítimas vivas é direcionado mediante o tempo transcorrido do ato da violência até a denúncia. Nas primeiras 72 horas após o delito, as vítimas são atendidas nos hospitais referência de Curitiba - Hospital de Clínicas da UFPR, Hospital Pequeno Príncipe e Hospital Evangélico. Os médicos legistas do Instituto Médico Legal (IML) são solicitados, mediante ofício da instituição que irá averiguar o delito, para que se proceda a coleta de material que, em crimes sexuais, incluem *swabs* vaginais, anais, orais ou de superfície do corpo. Além de *swabs*, podem ser coletadas também vestes (pequenas) no ato da consulta, ou vestes maiores e objetos nas delegacias. Após 72 horas, as vítimas são encaminhadas para a coleta diretamente no IML de Curitiba. No caso de vítimas que foram a óbito, o médico legista coleta as amostras e/ou vestes e as encaminha para análise.

Os materiais coletados, são enviados ao Laboratório de Bioquímica Forense, no IML de Curitiba, para averiguar a presença de sêmen, utilizando preferencialmente dois métodos de análise: determinação e quantificação da proteína específica da próstata (PSA, do inglês *Prostate-specific Antigen*) e presença de espermatozoides. Estas análises evidenciam a presença de material biológico depositado pelo agressor e suportam a acusação de estupro, juntamente com os demais exames realizados, principalmente o de conjunção carnal. A conjunção carnal é definida por Croce (2012) como “introdução parcial ou total, do pênis em ereção na vagina, haja ou não ejaculação”. Assim, este exame é realizado pelo perito médico legista, que analisando o corpo da vítima, produz um laudo relatando a ocorrência da conjunção carnal, além de diversas lesões características nela encontradas (Croce, 2012). Porém, em muitos casos, não é encontrado material biológico do agressor, o que não significa necessariamente que não houve violência sexual. Após a realização do exame preliminar, o material biológico é examinado pela Bioquímica Forense é encaminhado para o Laboratório de Genética Molecular Forense (LGMF), no Instituto de Criminalista (IC) de Curitiba, para a

tentativa de recuperação de material genético do agressor. A forma mais comum de se obter material viável da amostra coletada é recuperando espermatozoides do extrato dos *swabs* (Chapman, 1989).

No Laboratório da Bioquímica Forense, como parte da análise do material, são produzidas lâminas para a pesquisa de espermatozoides. Ao analisar a lâmina em sua totalidade, o perito criminal a classifica quanto ao número de espermatozoides visualizados, de acordo com padrão interno próprio do laboratório. Nas lâminas onde não são observados espermatozoides, a classificação é feita como “Ausente”, para uma lâmina com 1 a 5 espermatozoides, são “Raros”, de 6 a 20 “Moderados” e as com mais de 20 espermatozoides observados, são classificadas como “Vários”.

Atualmente as lâminas produzidas no Laboratório de Bioquímica Forense são descartadas e o extrato restante é enviado para o Laboratório de Genética Molecular Forense.

O LGMF é responsável pela obtenção e análise do perfil de DNA (Ácido Desoxirribonucleico, sigla em inglês) dos casos criminais de todo o estado do Paraná. A obtenção de DNA é de extrema importância em casos criminais (Jobling & Gill 2004), especialmente os de estupro nos quais material genético proveniente do criminoso é encontrado no corpo (Garvin et al 2012), roupas ou objetos da vítima, representando dessa forma, a evidência confirmadora do delito e com potencial de promover a identificação do agressor (Romero-Montoya et al 2011, Gingras et al 2009, Bozzo et al 2009).

Porém, para que seja possível a obtenção de perfil genético através da genotipagem das sequências de repetição curta ou *short tandem repeat* (STR), é necessário a obtenção de 0,5 a 2,0ng de DNA para que sejam submetidos à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR, sigla em inglês) (Butler, 2012). Nem sempre a quantidade de DNA ideal é obtida, principalmente das amostras classificadas como “raros”, as quais apresentam de 1 a 5 espermatozoides observados em uma lâmina inteira. Portanto, o restante do material enviado ao LGMF provavelmente não apresentará quantidade ideal de células masculinas. Da mesma maneira, o material proveniente de amostras com 6 a 20 espermatozoides (moderados) também representam uma baixa possibilidade de se obter material masculino, quando comparado com amostras de vários espermatozoides. Além disso, pelo efeito estocástico da pipetagem, o perito pode ter coletado todos os espermatozoides presentes no precipitado do extrato para a confecção da lâmina, o que esgotaria a porção masculina enviada para análise de DNA, inviabilizando a posterior obtenção de perfil genético masculino, culminando com a não identificação do suspeito.

Tendo em vista que as lâminas utilizadas para os testes preliminares, no Laboratório de Bioquímica Forense são descartadas após a análise, a recuperação dos espermatozoides nelas encontradas podem ser utilizados para a obtenção de perfil genético. Portanto, a elaboração de um protocolo para este fim, pode proporcionar uma nova oportunidade para a identificação de agressores nos casos de estupro. Aumentando, desta maneira, as chances de sucesso na conclusão de casos desta natureza, bem como fornece uma nova fonte de material a ser armazenado como contra-prova.

Dentro deste contexto, este trabalho teve por objetivo verificar a possibilidade de recuperação e análise de DNA a partir de lâminas de testes confirmatórios para presença de espermatozoide a fim de implantar mais uma possibilidade de identificação de agressores sexuais na rotina do Laboratório de Genética Molecular Forense.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Violência sexual, crime no contexto nacional e internacional**

A violência sexual é um crime hediondo, que causa grande sofrimento físico, psicológico e social para a vítima. A maioria das vítimas deste tipo de crime são mulheres (Ministério da saúde, 2012; Grossin et al, 2002). As faixas etárias mais atingidas são as de 10 a 19 anos e depois de 20 a 29 anos (SSEP-PR, 2015). Segundo o Ministério da Saúde (2012), no mundo, uma em cada três mulheres foram espancadas ou sofreram violência sexual. Ainda, estima-se que 12 milhões de pessoas (sexo masculino e feminino) sofram violência sexual a cada ano. O estupro passou a ser um crime contra a dignidade e liberdade sexual no Brasil apenas em 2009, pela lei nº 12.015, de 7 de agosto de 2009, e que anteriormente era apenas tido como um crime contra os costumes. Isso significa que a violência sexual era considerada crime apenas se familiares (homens) da vítima se sentissem afetados pelo crime (Croce, 2012). Tal visão machista, semelhante a transferência da culpa do crime para a vítima (por terceiros), além de causar maior sofrimento, resulta na omissão do crime sofrido, reduzindo o número de casos notificados às autoridades e fazendo com que não ocorra a coleta de material. Sendo assim, os responsáveis não são identificados e esse tipo de crime acaba por perpetuar pela impunidade.

### **2.2 Atendimento e Coleta de Material**

O Atendimento e coleta de material das vítimas de violência sexual são diferenciados para vítimas que procuraram pelo serviço em até 72 horas e vítimas após 72 horas do ocorrido. Essa diferença de atendimentos é justificada pelo fato de que 72 horas após o crime, os exames de prevenção de DSTs virais e anti-gravidez já são ineficazes. No primeiro caso,

o atendimento é feito diretamente nos hospitais referência para este tipo de coleta na cidade de Curitiba, são esses Hospital das Clínicas – HC/UFPR e Hospital Evangélico para vítimas adultas e Hospital Pequeno Príncipe para crianças. As coletas atualmente são realizadas por um perito médico legista de plantão no hospital, e futuramente, segundo projeto recentemente proposto pela Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, serão feitas por funcionários devidamente treinados do próprio hospital. O projeto pretende ainda se estender para as demais cidades do estado do Paraná (SSEP – PR, 2015). Atualmente, após 72 horas, as coletas são realizadas diretamente no IML-PR, por um perito médico legista, mas no futuro as coletas também serão realizadas nos hospitais referência. Ainda há o caso de vítimas que foram a óbito, onde então o médico legista coleta as amostras e/ou vestes diretamente no IML e as encaminha para análise.

### 2.3 Processamento das Amostras

As amostras coletadas são encaminhadas pelos médicos ao IML-PR e chegam ao Laboratório de Bioquímica Forense, onde são devidamente processadas. Quanto ao processamento realizado, pode-se separar os materiais recebidos em duas classes: *swabs* e vestes/objetos.

Para amostras de *swab*, é feita maceração do material, visando a recuperação de possíveis espermatozoides que tenham permanecido no corpo das vítimas após o crime. Os *swabs* são submetidas à incubação de 12 a 24 horas com 1 ml de tampão PBS (*Phosphate buffered saline*) 1x, utilizada para que o material coletado no *swab* se desprenda e permaneça em solução. Em seguida, os *swabs* são retirados e as amostras são agitadas e centrifugadas. Após a centrifugação, a amostra apresenta-se bifásica, tendo uma porção líquida (sobrenadante) e uma porção sólida ao fundo do tubo (sedimento). Do extrato (sedimento) obtido do material processado são produzidas lâminas, as quais são coradas e examinadas ao microscópio óptico para a presença e quantificação de espermatozoides (Sawaya & Rolim, 2006; POP 06), e o sobrenadante é utilizado na determinação da concentração do PSA.

Para vestes/objetos é necessária a utilização de luz forense para orientar o local das manchas de sêmen. A visualização da mancha, proveniente da deposição de material biológico, é observada pela fluorescência emitida através da incidência de luz em um comprimento de onda de 470nm; é utilizado ainda um filtro de barreira na cor alaranjada (neste caso, é utilizado um óculos alaranjado). A intensidade da luz depende da quantidade de material ali existente. O procedimento é realizado em sala escura para que a luz ambiente não interfira na reação. As manchas identificadas são posteriormente recortadas, maceradas em PBS e observadas ao microscópio óptico da mesma forma que os *swabs* (Sawaya &

Rolim, 2006; POP 07). Cabe ressaltar que a presença de fluorescência no material periciado é um teste de orientação, podendo assim, apresentar resultados positivos para outros materiais biológicos (suor, secreções, dentre outras) e químicas (pomadas, desodorantes, entre outros). Os extratos restantes, neste e no primeiro caso, são enviados para o LGMF.

## 2.4 Genética Forense

Desde o início da utilização do DNA em casos forenses em 1985, quando pela primeira vez o DNA foi responsável pela resolução de um caso criminal que culminou na identificação de Colin Pitchfork, acusado de duplo homicídio em Leicestershire, no Reino Unido (Jobling & Gill 2004), esta ferramenta vem sendo utilizada em casos criminais onde é necessário acusar ou inocentar um suspeito (Connors, 1996; Jobling & Gill 2004). Diversas são as fontes de material genético encontradas em indivíduos ou cenas de crime, como por exemplo; sangue, sêmen, saliva e até mesmo digitais (Oorschot et al, 1997), entre outros. Avanços na tecnologia da biologia molecular e o desenvolvimento de protocolos operacionais padrão (POPs), ajudaram a estabelecer o DNA como uma evidência sólida e amplamente aceita nos tribunais.

Poucos casos de violência sexual são notificados e somente parte deste são submetidos obtenção a análise de material biológico. Entretanto, não há garantia de obtenção de um perfil genético devido a exígua quantidade de amostra nesse tipo de crime.

Atualmente os marcadores STR (do inglês, *Short Tandem Repeats*), são usualmente utilizados para a obtenção de informação genética de amostras biológicas. Estes marcadores são microssatélites presentes em diversas regiões do genoma humano e são sequências curtas de repetição contendo entre 2 e 6 nucleotídeos. Os marcadores são escolhidos seguindo determinados critérios que garantam a identificação humana, tais como: baixa taxa de mutação; elevado grau de polimorfismo; possibilidade de previsão do tamanho dos alelos, sendo os menores muito importantes na análise de DNA degradado; e a capacidade de se estudar diversos STR ao mesmo tempo, em uma única reação (Butler, 2005). Porém, sua popularidade se deu pelo fato de serem facilmente amplificados por PCR (do inglês, *Polymerase chain reaction*). Em seguida à amplificação, os STRs são submetidos a eletroforese capilar para a análise de tamanho de fragmentos para a obtenção de perfil genético individual. A eletroforese capilar, feita de maneira automatizada em sequenciadores, possibilita que os dados sejam analisados em *softwares* específicos que resultam em informações sobre os alelos presentes nos *loci* analisados, formando um eletroferograma onde pode ser visualizado o perfil genético (Butler, 2005). A partir daí, com base na frequência alélica obtida por um banco de dados populacional pode-se calcular a probabilidade de identificação de um indivíduo (Pinheiro, 2004). A análise estatística indica de forma confiável

a frequência da ocorrência do perfil na população e se um indivíduo é doador da amostra padrão em questão.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Recuperar amostras de DNA masculino a partir de lâminas produzidas para testes confirmatórios de sêmen em amostras de crimes sexuais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Preparar lâminas que reproduzam as situações de raros, moderados e vários espermatozoides a partir de sêmen de doador voluntário;
- Padronizar e avaliar a eficácia do método de lavagem de lâminas com raros, moderados e vários espermatozoides;
- Recuperar perfis genéticos viáveis de lâminas de testes confirmatórios para presença de espermatozoide.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos aplicados a todas as amostras deste trabalho dividem-se em duas fases, a primeira no Laboratório de Bioquímica Forense do IML-PR e a segunda no Laboratório de Genética Molecular Forense do IC-PR.

#### **4.1 Preparo das lâminas**

Para a determinação de um protocolo de recuperação dos espermatozoides visualizados nos testes confirmatórios, foram confeccionadas lâminas que simulam os casos de “raros”, “moderados” e “vários” espermatozoides. Para tanto, foi utilizada uma amostra de sêmen puro de doador voluntário que foi diluída serialmente (1:10; 1:20; 1:50 e 1:100). Estas passaram por todo o processo de recuperação do material e obtenção de perfil genético, para a verificação da eficácia do protocolo.

Para observação e contagem de espermatozoides, as lâminas receberam 10µL do sedimento da amostra diluída e centrifugada, assim como 10µL de corante eosina B. Este corante permite diferenciar o citoplasma de diferentes células, tecidos e fibras, dando tons de vermelho e rosa para os diferentes componentes celulares (Bancroft, 2013). As preparações foram cobertas com lamínula e foi feita a análise a fresco sob o microscópio óptico com aumento de 400x. Após a contagem e classificação, as lâminas foram lavadas conforme

protocolo desenvolvido neste estudo e submetidas à extração diferencial e orgânica; precipitação alcoólica; quantificação; amplificação e análise dos fragmentos de DNA.

Após os testes iniciais, foram coletadas 59 amostras de casos de estupro reais de rotina, dentre as diversas classificações (exceto “ausentes”) comumente encontradas pela Bioquímica Forense, para que passassem por todo o processo de recuperação de material e obtenção de perfil genético.

## **4.2 Lavagem de Lâminas**

Logo após a observação e classificação, lâminas e lamínulas foram lavadas seguindo protocolo desenvolvido especificamente para esta prática, assim, foram colocadas em posição vertical dentro de um *becker* de vidro com capacidade de até 25mL e lavadas com até 700µL de solução salina. O líquido foi sugado do fundo do *becker* e dispensado sobre lâmina e lamínula quantas vezes necessário até sua lavagem completa. A solução final obtida foi coletada com pipeta automática e armazenada a -20°C para posterior extração do DNA.

## **4.3 Extração de DNA**

A extração do DNA foi feita pelo método diferencial como descrito primeiramente por Gill (1985) e posteriormente adaptado por Yoshida (1995), e aceito pelo Federal Bureau of Investigation (FBI) dos Estados Unidos como protocolo padrão para extração diferencial de DNA. Neste método é possível extrair separadamente o DNA dos espermatozoides dos demais tipos celulares.

As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 16500 x g para que os espermatozoides fossem concentrados no fundo do microtubo, com a finalidade de maximizar a eficácia da extração diferencial.

O material líquido sobrenadante foi guardado como contraprova e ao material precipitado no fundo do tubo (*pellet*) foi adicionado 300µL de tampão de mancha (composto por tampão tris HCl 1M pH 7,0, dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, EDTA 0,5M e NaCl 5M) e 40µL de proteinase K a 10mg/mL. O material foi incubado no banho seco com agitação a 37°C por 2 horas. Ao fim da incubação, o material foi centrifugado por 5 minutos a 16500 x g; o sobrenadante foi transferido para outro tubo, o qual continha a fração feminina (FF), pois é onde provavelmente se encontram o material que estava presente nas células (principalmente epiteliais) que foram lisadas nesta primeira fase da extração (Gill et al, 1985). O *pellet*, chamado agora de fração masculina (FM), onde provavelmente se encontram os espermatozoides ainda intactos, passou por três lavagens consecutivas que consistem em adição de 300µL de tampão de lavagem (composto por tampão tris HCl 1M pH7,0, dodecil

sulfato de sódio (SDS) 20%, EDTA 0,5M e NaCl 5M); agitação; centrifugação e descarte do tampão.

Em seguida, a FM passou por mais uma incubação, após adição de 300µL de tampão de machas; 40µL de proteinase K a 10mg/mL e 10µL de *Dithiothreitol* (DTT) 154mg/mL. Nessa fase, há o rompimento das pontes de dissulfeto que compõe as membranas do espermatozoide pelo DTT, onde o DNA é liberado para a solução (Butler, 2012, Gill et al, 1985). A incubação foi feita em banho seco com agitação a 37°C por 2 horas. Durante esse tempo, a FF permaneceu armazenada a -20°C.

O DNA das frações masculina e feminina foram obtidos por extração orgânica com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). A cada uma das amostras foi realizado o seguinte protocolo por duas vezes: Adição de 500µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1); agitação, centrifugação, descarte do sobrenadante (mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e impurezas). Em seguida, após o último descarte, ao extrato puro foram adicionados 700 µL de álcool absoluto e os tubos foram mantidos a -20°C por 24 horas para que ocorresse a precipitação do DNA.

Ao final da precipitação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 16500 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados em banho seco a 56°C até que todo o álcool fosse evaporado. Depois de secos, os tubos receberam cada um 40 µL de água destilada e deionizada e foram agitados, para que o DNA depositado ao fundo do tubo pela centrifugação fosse ressuspendido.

#### 4.4 Quantificação do DNA

Terminadas as etapas de extração e purificação, a concentração de DNA contida em cada amostra foi estimada por PCR quantitativa (qPCR) em tempo real. A quantificação foi realizada no equipamento *7500 Real-Time PCR system* (Applied Biosystems); e foi utilizado o *kit* de amplificação *Plexor® HY System* (Promega). Segundo o protocolo fornecido pelo *kit*, 2µL de extrato de DNA foram adicionados a 18µL de mistura de reação de qPCR composta por par de *primers*, *mix* de PCR e água fornecidos. As ciclagens seguiram os parâmetros padrão (Quadro 1). A concentração ideal para o *kit* é de 0,25ng/dL de DNA. Após a PCR, para a análise dos dados da quantificação o software de análise classifica as amostras que apresentam a quantidade ideal de DNA, como *In range*. Para as classificadas como *above target*, significa que possuem mais DNA do que o ideal, mas ainda é possível realizar a PCR com a amostra pura. As classificadas como *overconcentration*, devem ser diluídas antes de se proceder a PCR. Valores indicados como *below target*, não alcançaram a quantidade ideal, mas ainda possuem quantidade suficiente de DNA para a reação de PCR. Para os indicados



como *undercontraction*, foi detectado DNA na amostra, porém não alcançou a quantidade mínima aceitável; e *no target*, quando não é detectado DNA na amostra (Promega, 2013). O método de PCR em tempo real foi utilizado neste trabalho, pois possibilita a determinação das concentrações e quantidades de DNA amplificado a partir de STRs autossômicos e do cromossomo Y separadamente, além de informar sobre a possível presença de inibidores de PCR.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
<b>Desnaturação Inicial</b>	95°C	2 Minutos	1 ciclo
<b>Desnaturação</b>	95°C	5 Segundos	38 ciclos
<b>Anelamento e Extensão</b>	60°C	35 Segundos	1 ciclo

QUADRO 1. PROGRAMA DE CICLAGEM TÉRMICA PARA O KIT PLEXOR® HY SYSTEM UTILIZADO NA PCR REAL TIME. FONTE: Adaptado de *Plexor® HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR Systems technical manual* (2016).

#### 4.5 Amplificação do DNA

As amostras de DNA foram amplificadas em uma PCR multiplex, utilizando o termociclador *GeneAmp Thermal Cycler 9800* e o kit *PowerPlex® Fusion system* (Promega), para a amplificação de fragmentos STR autossômicos. As ciclagens seguiram os parâmetros padrão (Quadro 2).

Temperatura	Tempo	Ciclos
<b>96°C</b>	1 Minuto	1 ciclo
<b>94°C</b>	10 Segundos	
<b>59°C</b>	1 Minuto	
<b>72°C</b>	30 Segundos	30 ciclos
<b>60°C</b>	10 Minutos	1 ciclo
<b>4°C</b>	-	Mantém até o fim

QUADRO 2. PROGRAMA DE CICLAGEM TÉRMICA PARA O KIT POWERPLEX® FUSION SYSTEM. FONTE: Adaptado de *PowerPlex® Fusion system technical manual* (2016).

#### 4.6 Análise de tamanho de fragmentos

As amostras foram analisadas para pesquisa de STR de loci de cromossomos autossômicos.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese capilar no sequenciador 310 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e os dados foram analisados utilizando o *software*

*Genemapper IDX* (Applied Biosystems) por comparação com escada alélica e marcadores de tamanho fornecidos nos *kits PowerPlex® Fusion system*.

*PowerPlex® Fusion system* (Promega) é um sistema STR *multiplex* que identifica 24 loci, são eles: D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D1S1656, D2S441, D10S1248, D2S1338, D12S391, D19S433, D22S1045, DYS391, amelogenina (loco de determinação sexual) e loci STR de pentanucleotídeos Penta E e Penta D.

## 5. RESULTADOS

Para o desenvolvimento do protocolo de lavagem das lâminas, foram utilizadas amostras de sêmen de doador voluntário, que foram diluídas, a fim de se reproduzir os resultados que geralmente ocorrem no laboratório de Bioquímica Forense. As diluições que resultaram em números de espermatozoides que reproduzem os casos de “vários”, “moderados” e “raros” são mostradas no quadro 3.

Amostras
1:10 – Vários
1:20 – Vários
1:20 – Moderados
1:50 – Moderados
1:100 – Raros 1
1:100 – Raros 2

QUADRO 3. DILUIÇÕES UTILIZADAS PARA PRODUZIR AS LÂMINAS QUE SIMULAM DIFERENTES QUANTIDADES DE ESPERMATOZOIDES ENCONTRADAS NAS LÂMINAS DE TESTES CONFIRMATÓRIOS PARA PRESENÇA DE ESPERMATOZOIDES. FONTE: A autora (2015).

Logo após a observação e classificação, lâminas e lamínulas foram lavadas seguindo protocolo desenvolvido especificamente neste estudo para esta prática, como descrito anteriormente.

A extração de DNA foi feita pelo método diferencial, no qual obtém-se DNA separadamente de espermatozoides e dos demais tipos celulares. Esta extração foi realizada em etapas, de modo que a fração que contém espermatozoides seja extraída em um microtubo e as demais células em outro.

A quantificação de DNA das 12 amostras teste por *PCR real time* apresentou quantidades inferiores a 0,2ng, sendo classificadas com ‘undeconc.’ conforme as especificações do *kit*. Cabe ressaltar que cada amostra apresenta duas frações, uma

identificada como FF (Fração Feminina) e outra como FM (Fração masculina), cmo relatado no item 4.3 do material e métodos. Os resultados estão apresentados no Quadro 4.

A PCR foi realizada utilizando as amostras puras, sem diluição, visto que a quantificação indicou a presença de concentração de DNA reduzida. A *mix* de PCR foi feita utilizando o *kit PowerPlex® Fusion system*, composta por *mix*, par de *primers* e água. As quantidades de reagentes e ciclagens seguiram os protocolos e parâmetros padrão.

Raros espermatozoides						
Amostras	DNA AUTOSSÔMICO		Perfil Genético	DNA do Y		Perfil Genético
	Quantida de (ng)	Status		Quantida de (ng)	Status	Presença cromos. Y
Raros 1 FF 1:100	0,024628	Underconc.	N/A	0,006425	Underconc.	N
Raros 1 FM 1:100	0,006803	Underconc.	N/A	0	No Target	N
Raros 2 FF 1:100	3,186031	Below Target	N/A	0	No Target	N
Raros 2 FM 1:100	0,015425	Underconc.	N/A	0,001974	Underconc.	N
Moderados espermatozoides						
Amostras	DNA AUTOSSÔMICO		Perfil Genético	DNA do Y		Perfil Genético
	Quantida de (ng)	Status		Quantida de (ng)	Status	Presença cromos. Y
Moderados FF 1:20	0,10875	Underconc.	N/A	0,049195	Underconc.	N
Moderados FM 1:20	0,03996	Underconc.	PM	0,039356	Underconc.	S
Moderados FF 1:50	0,009122	Underconc.	N/A	0,003113	Underconc.	N
Moderados FM 1:50	0,005178	Underconc.	PM	0,007861	Underconc.	S

Vários espermatozoides						
Amostras	DNA AUTOSSÔMICO		Perfil Genético	DNA do Y		Perfil Genético
	Quantidade (ng)	Status		Quantidade (ng)	Status	Presença cromos. Y
Vários FF 1:10	0,328521	Underconc.	PM – PL	0,190629	Underconc.	S
Vários FM 1:10	0,031367	Underconc.	PM	0,015635	Underconc.	S
Vários FF 1:20	0,111201	Underconc.	PM	0,054593	Underconc.	S
Vários FM 1:20	0,015491	Underconc.	PM	0,013961	Underconc.	S

QUADRO 4. RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO E DA ANÁLISE DE TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE DNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS TESTE DE LÂMINAS COM DIFERENTES QUANTIDADES DE ESPERMATOZOÍDES. FONTE: A autora (2015). LEGENDA: NA= Não amplificou, S= Sim; N= Não; PF= Perfil Feminino; PM= Perfil Masculino; PL= Perda de Locus.

A análise dos fragmentos mostrou resultados positivos, com a obtenção de perfil genético para 6 das 12 amostras teste. A Figura 1 representa um dos resultados positivos, da amostra Vários FF 1:20.

Após a realização dos testes, foram coletadas no laboratório de Bioquímica Forense, 59 amostras de casos reais de estupro com resultados diversos, sendo elas: 31 de vários espermatozoides; 16 de moderados espermatozoides e 11 de raros espermatozoides. Seguindo o protocolo descrito, as lâminas foram lavadas, e seus extratos extraídos pelo método diferencial.

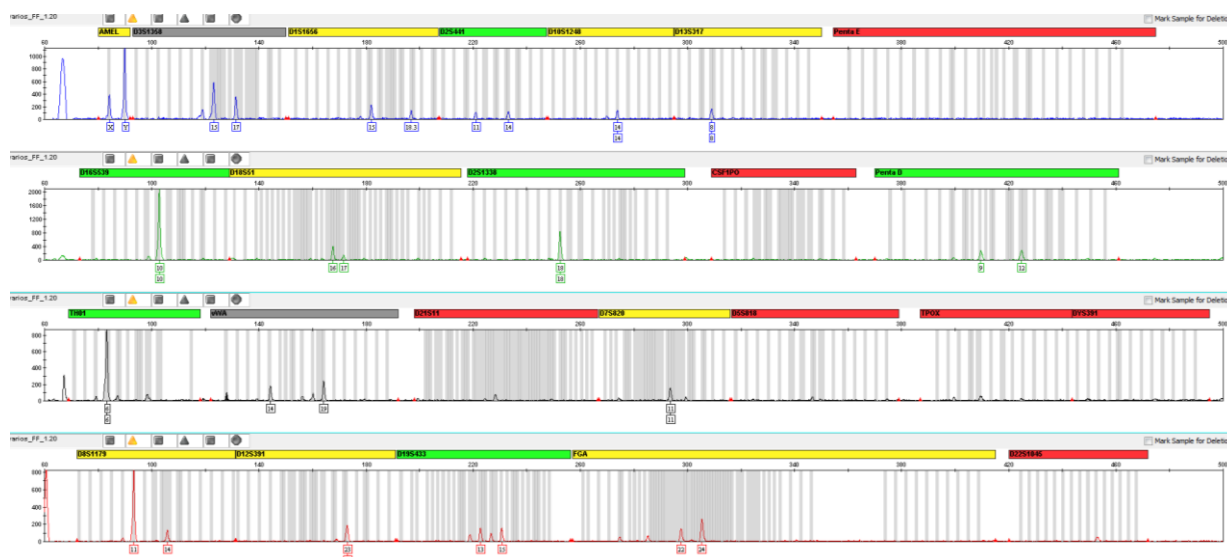


FIGURA 1. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO UM PERFIL ÚNICO MASCULINO OBTIDO DA AMOSTRA TESTE VÁRIOS FF 1:20. FONTE: A autora (2016).

Após a obtenção de um extrato puro de DNA, as amostras foram quantificadas, amplificadas e foi feita análise de tamanho dos fragmentos. Os resultados da quantificação são apresentados no Anexo B. Foram analisadas 115 frações referentes a 59 casos. As amostras 55FF e 58 FF e FM foram excluídas das análises devido à perda de material durante os processos de extração de DNA. Os resultados obtidos da análise de tamanho dos fragmentos estão demonstrados no Quadro 5.

Todas as amostras que indicavam *overconcentration* (alta concentração de DNA), para o cromossomo Y, corresponderam a mesma indicação para os cromossomos autossômicos.

Para amostras de raros espermatozoides que obtiveram alta concentração de DNA, esta constatação sempre ocorreu na fração feminina.

A análise dos eletroferogramas das 115 frações resultou em obtenção de perfil genético completo ou parcial para 88 amostras e 27 não amplificaram.

Raros espermatozoides			Moderados espermatozoides			Vários espermatozoides		
Amostras	Análise de fragmentos		Amostras	Análise de fragmentos		Amostras	Análise de fragmentos	
	Perfil Genético	Presença cromos. Y		Perfil Genético	Presença cromos. Y		Perfil Genético	Presença cromos. Y
02FF	PF	N	07FF	PF	N	01FF	PF	N
02FM	PM	S	07FM	M	N	01FM	PM - PPA	S
08FF	PF	N	11FF	PF - PML	N	03FF	PF	N
08FM	PF	N	11FM	PM - PML	S	03FM	PM	S
10FF	NA	N	20FF	PM	S	04FF	NA	N
10FM	NA	N	20FM	PM	S	04FM	PM	S
12FF	PF - PL	N	22FF	PF	N	05FF	PF	N
12FM	NA	N	22FM	NA	N	05FM	PM - PL	S
15FF	PF	N	24FF	PF	N	06FF	PF	N
15FM	PF	N	24FM	PM - PML	S	06FM	M	S
34FF	PF - PL	N	27FF	PF	N	09FF	PF	N
34FM	NA	N	27FM	PM - PML	S	09FM	PM	S
46FF	NA	N	31FF	PF	N	13FF	PF	N
46FM	NA	N	31FM	NA	N	13FM	PM	S
51FF	PF	N	35FF	PF	N	14FF	NA	N
51FM	NA	N	35FM	NA	N	14FM	PM - PML	S
53FF	PM	S	40FF	PF	N	16FF	M	S
53FM	PM	S	40FM	PM - PML	S	16FM	PM	S
56FF	PF	N	41FF	PF	N	17FF	PF	N
56FM	PF	S	41FM	NA	N	17FM	NA	S
57FF	NA	N	43FF	PF	N	18FF	PF	N
57FM	NA	S	43FM	NA	N	18FM	PF - PL	N
			49FF	NA	S	19FF	PM - PL	S
			49FM	PF - PML	N	19FM	NA	N
			52FF	NA	S	21FF	PF	N
			52FM	NA	N	21FM	PM	S
			54FF	PF	N	23FF	M	S
			54FM	M	S	23FM	PM	S
			55FM	M	S	25FF	M	N
			59FF	PF	N	25FM	M	S
			59FM	M	S	26FF	PF	N
						26FM	NA	N
						28FF	M	S
						28FM	PM	S
						29FF	PF	N
						29FM	PM	S
						30FF	PF	N
						30FM	PM	S
						32FF	PF	N
						32FM	NA	N
						33FF	PF	N
						33FM	NA	N
						36FF	PF	N
						36FM	NA	N
						37FF	PF	N
						37FM	M	S
						38FF	M	S
						38FM	PM - PL	S
						39FF	PF	N
						39FM	PF-PL	N
						42FF	PF	N
						42FM	PM - PML	S
						44FF	PF	N
						44FM	PM	S
						45FF	NA	N
						45FM	NA	N
						47FF	PF	N
						47FM	PM - PL	S
						48FF	M	S
						48FM	PM	S
						50FF	PF	N
						50FM	PM	S

QUADRO 5. RESULTADOS DA ANÁLISE DE TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE DNA EXTRAÍDO A PARTIR DE AMOSTRAS DE CASOS REAIS. FONTE: A autora (2016). LEGENDA: M= Mistura; NA= Não amplificou, S= Sim; N= Não; PF= Perfil Feminino; PM= Perfil Masculino; PL= Perda de Locus; PML= Perda de Muitos Loci.

Das 88 amostras onde foram obtidos perfis genéticos completos ou parciais, 32 apresentaram cromossomo Y, no locus amelogénina ou DY5391, um controle interno do cromossomo Y, que identifica regiões STR que confirmam sua presença mesmo quando são obtidos resultados de alelos Y nulos para amelogénina, portanto, é indicativo da presença de DNA masculino na amostra. 56 apresentaram perfil feminino.

## 6. DISCUSSÃO

As amostras de crimes sexuais encaminhadas ao LGMF são os extratos remanescentes do conteúdo utilizado para a confecção de lâminas para análise no Laboratório de Bioquímica Forense. Este extrato pode conter um número aproximado que represente o encontrado na lâmina ou não, dependendo da pipetagem. As baixas quantidades de DNA encontradas nos resultados da quantificação das amostras teste eram esperadas pelo fato das amostras representarem a solução após a lavagem de uma lâmina de pesquisa de espermatozoides. A obtenção de perfil nas amostras teste, principalmente naquelas classificadas como “moderados” espermatozoides, evidenciam a eficácia do protocolo de lavagem de lâminas desenvolvido, pois nas amostras com poucos espermatozoides de rotina, geralmente não é possível obter um perfil genético.

A amostra Moderados FM 1:20 representa uma amostra que comumente chegaria até o laboratório de DNA com o resultado da leitura de lâminas de baixo número de espermatozoides. Pode-se observar (Figura 2) que com a lavagem da lâmina pelo protocolo padrão gerado neste trabalho, foi possível recuperar um perfil genético único masculino.

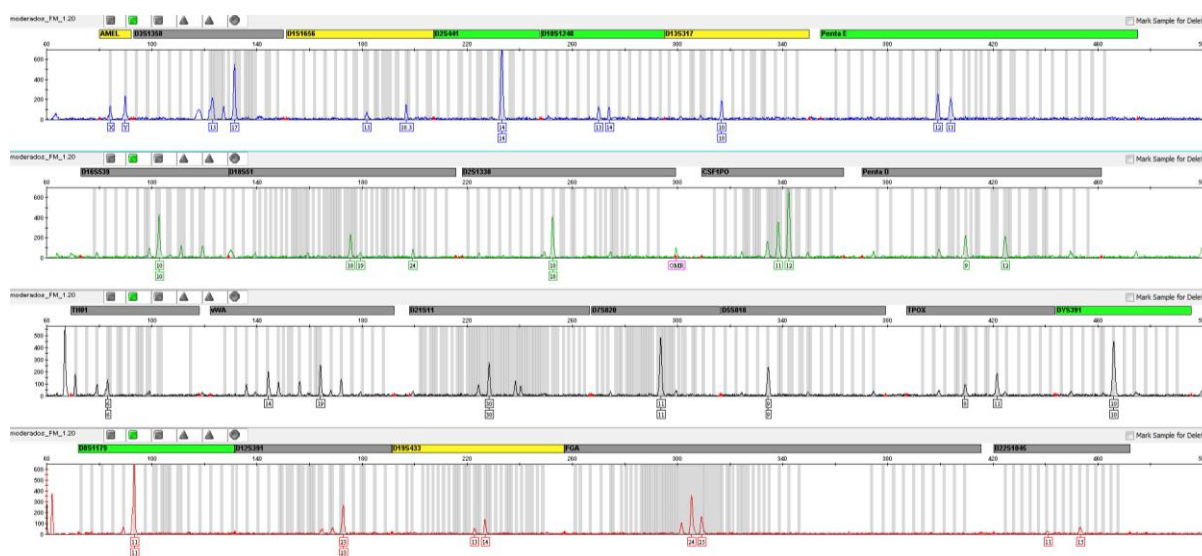


FIGURA 2. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO UM PERFIL ÚNICO MASCULINO OBTIDO DA AMOSTRA TESTE MODERADOS FM 1:20. FONTE: A autora (2016).

Amostras de vários espermatozoides geralmente não apresentam dificuldades de obtenção de perfil genético similares às demais, porém, o fato da recuperação de perfil quase completo de lâminas de testes confirmatórios demonstra, mais uma vez, a eficiência da técnica de lavagem. O eletroferograma abaixo (Figura 3), revela o perfil obtido para uma das amostras teste de vários espermatozoides.

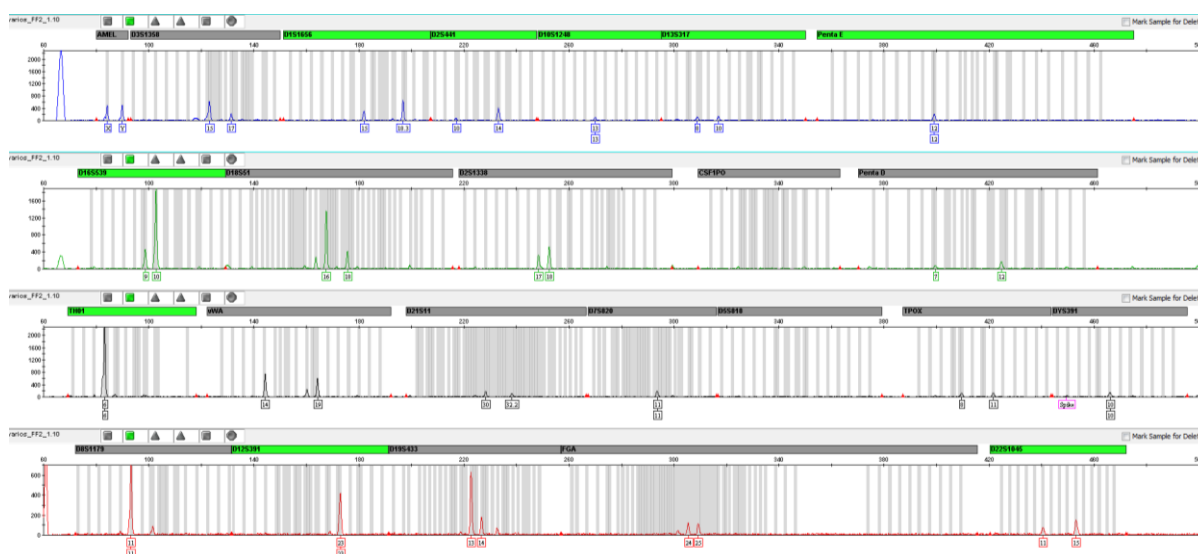


FIGURA 3. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO UM PERFIL ÚNICO MASCULINO OBTIDO DA AMOSTRA TESTE VÁRIOS FF 1:10. FONTE: A autora (2016).

Os resultados obtidos para as amostras de casos reais, firmam a eficácia do método empregado para a recuperação de material depositado nas lâminas, já observado anteriormente nos resultados das amostras teste. Nos resultados da quantificação de DNA, é possível observar a presença de material genético proveniente de cromossomos STR para todas as amostras testadas, em quantidades variadas, pois as amostras coletadas estão distribuídas aleatoriamente dentre as diversas classificações para o teste de presença de espermatozoides.

Nos resultados da quantificação (Anexo B), podemos observar que, as amostras 3FM, 13FM e 48FM, classificadas como vários espermatozoides, obtiveram alta concentração de DNA para o cromossomo autossômico. As amostras 13 e 48 foram as únicas das 115 totais, a apresentarem alta concentração de DNA para o cromossomo Y. Na análise dos fragmentos foi possível verificar a obtenção de perfil genético completo único masculino para estas amostras, corroborando com os resultados da quantificação.



Amostras 2, 8, 15 e 51 de raros espermatozoides obtiveram *overconcentration* (Anexo B) na quantificação, para a fração feminina, explicado pela presença de muitas células epiteliais femininas nos *swabs* ou pertences coletados das vítimas. Nas frações masculinas correspondentes destaca-se a amostra 2FM onde foi obtido um perfil parcial masculino com 19 loci viáveis (Figura 4). Este resultado é de grande importância quando observamos a possibilidade de recuperar perfis genéticos viáveis de amostras geralmente problemáticas para o laboratório de genética forense e ainda, de um material que é atualmente descartado. Este perfil embora parcial seria suficiente para a identificação de um agressor, pois a análise estatística do confronto do perfil genético da evidência com o perfil padrão do agressor apresentaria valores que possibilitariam a inclusão segura. As frações masculinas das amostras 8 e 15 apresentaram perfis femininos, explicado pela presença de muitas células epiteliais femininas nos *swabs* ou pertences coletados das vítimas.

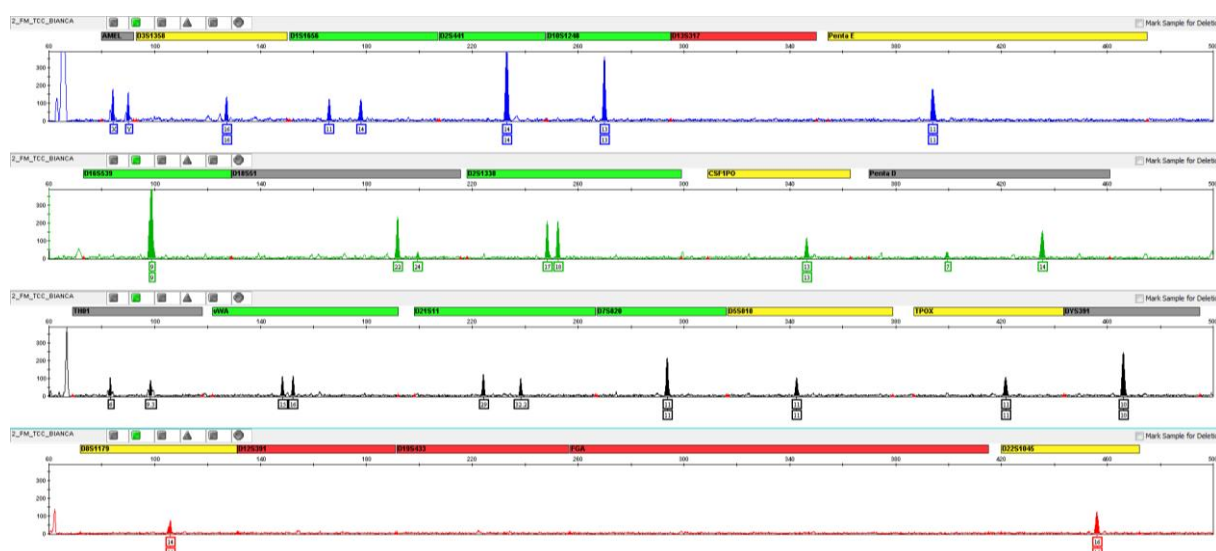


FIGURA 4. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO UM PERFIL PARCIAL ÚNICO MASCULINO OBTIDO DA AMOSTRA RAROS 2FM. FONTE: A autora (2016).

As demais amostras que obtiveram alta concentração de DNA para os cromossomos autossômicos foram apenas frações femininas, resultado esperado em casos de estupro onde a coleta de material resulta em grande concentração de células epiteliais da vítima nos *swabs* encaminhados para exame.

Nas frações masculinas dos 11 casos de raros espermatozoides, foram obtidos dois perfis masculinos, um parcial (2FM) e um completo (53FM), três perfis femininos, em 8FM, 15FM e 56FM, sendo que neste último, foi possível observar a presença do locus DY5391. Seis dessas frações masculinas não amplificaram, impossibilitando a obtenção de perfil

genético. A quantidade reduzida de espermatozoides observada nas lâminas, juntamente com as baixas concentrações de DNA do cromossomo Y na quantificação, justificam a ausência de perfil.

Para a amostra 53FM embora classificada como raros espermatozoides e com a indicação de *below target* (abaixo da quantidade ideal de DNA) (Anexo B), para a concentração de DNA do cromossomo Y, e *underconcentration* para a concentração dos STR, foi possível obter um perfil genético completo único masculino (Figura 5). Assim como a amostra 2FM, a fração 53FM destaca-se devido a obtenção de perfil masculino completo. Este resultado é de grande importância na prática da genética forense, pois são amostras de difícil recuperação de material masculino viável. Na amostra 53FF também foi possível recuperar um perfil masculino com alta quantidade de DNA. Neste caso, é provável que muitas células epiteliais masculinas estivessem presentes no extrato do material coletado da vítima, e que estas, foram extraídas juntamente com as células epiteliais da vítima na primeira etapa da extração diferencial.

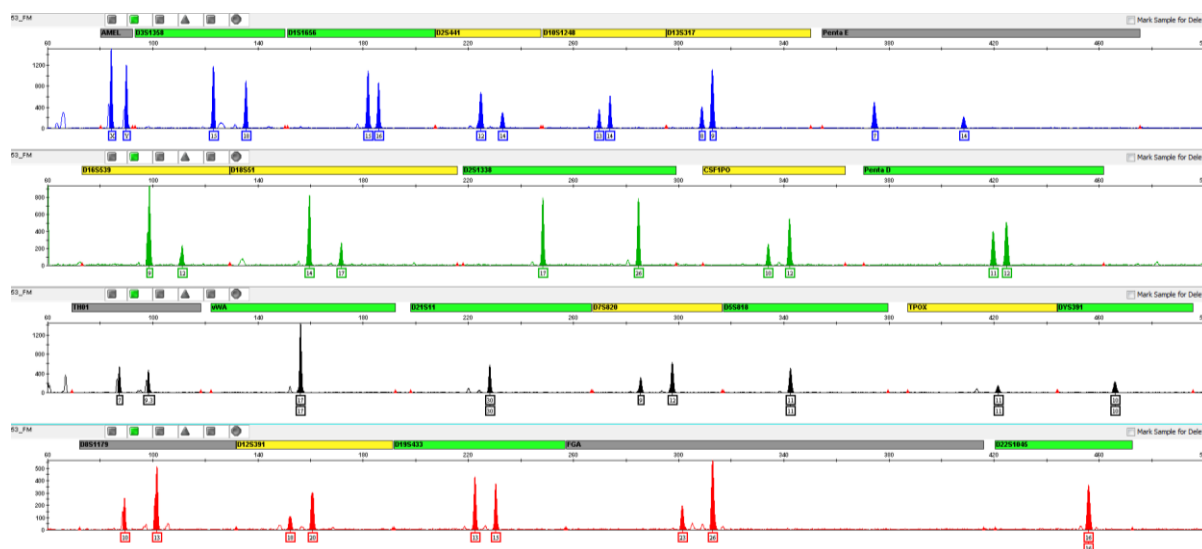


FIGURA 5. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO UM PERFIL COMPLETO ÚNICO MASCULINO OBTIDO DA AMOSTRA RAROS 53FM. FONTE: A autora (2016).

As análises dos fragmentos dos 16 casos de moderados espermatozoides, resultaram em mistura para as amostras 7FM, 54FM e 55FM, sendo que suas frações femininas apresentaram elevada concentração de DNA, exceto para 55FF que foi retirada das análises devido à perda de material relatada anteriormente. A solução para resolver o caso de mistura dessas amostras é realizar amplificação das regiões STRs do cromossomo Y, com *kit* de amplificação específico.

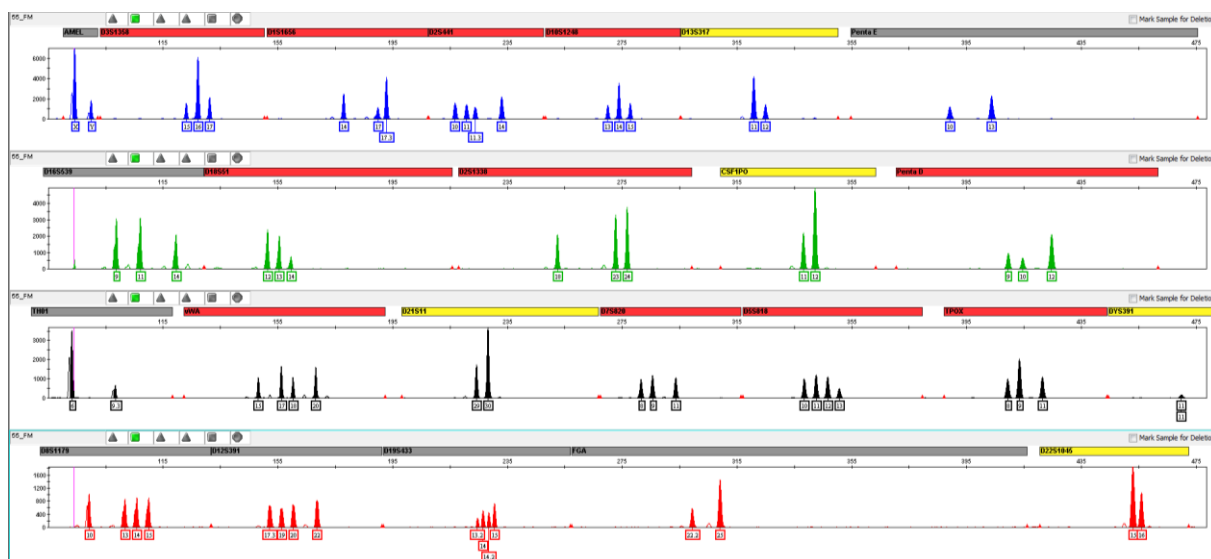


FIGURA 6. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO UM PERFIL COMPLETO DE MISTURA MOSTRANDO A PRESENÇA DE PELO MENOS DOIS INDIVÍDUOS, SENDO UM DELES DO SEXO MASCULINO, OBTIDO DA AMOSTRA MODERADOS 55FM. FONTE: A autora (2016).

Ainda para os casos de moderados, em dez amostras (11FM, 20FF/FM, 24FM, 27FM, 40FM, 49FF, 52FF, 54FM, 55FM) foi possível observar a presença do cromossomo Y no marcador para amelogenina e/ou no controle interno DY5391. Destas, duas amostras são de frações femininas (49FF e 52FF) sugerindo que ocorreu a extração de células epiteliais masculinas presentes nos extratos do material coletados dos pertences das vítimas, pois suas respectivas frações masculinas não amplificaram.

A amostra 20, apresentou perfil masculino em ambas as frações, feminina e masculina, possibilitando a identificação de um perfil masculino completo e único em uma amostra de moderados espermatozoides (Figura 6).

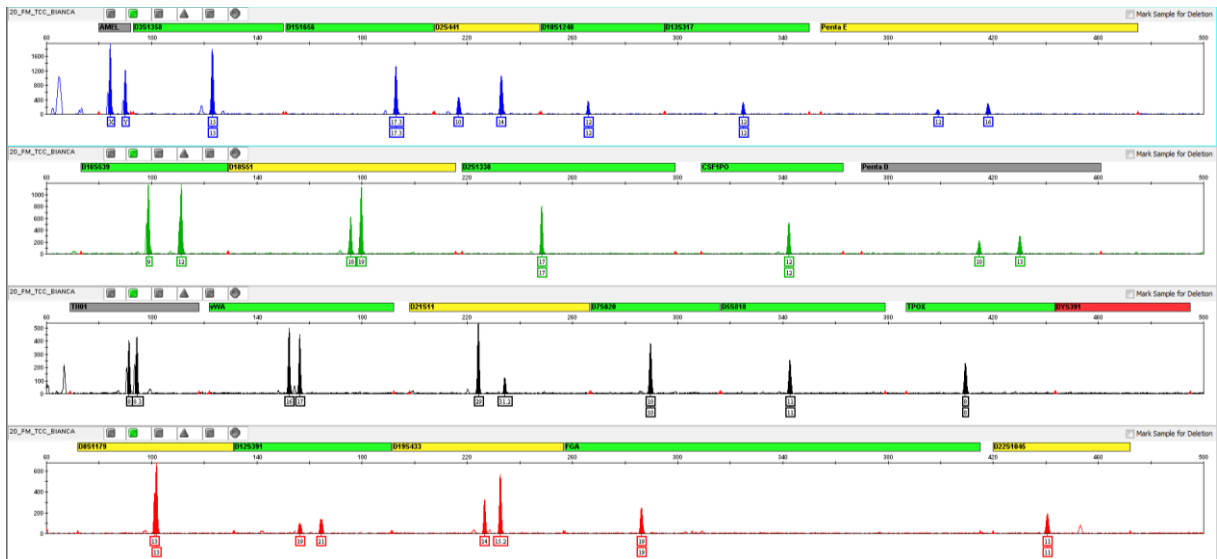


FIGURA 7. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO UM PERFIL COMPLETO ÚNICO MASCULINO OBTIDO DA AMOSTRA MODERADOS 20FM. FONTE: A autora (2016).

Para os 31 casos de vários espermatozoides (total de 62 amostras) 22 frações femininas apresentaram perfis femininos; 6 apresentaram perfis masculinos e 3 não amplificaram. Para as respectivas frações masculinas foi obtido em 22 perfis genéticos de indivíduo do sexo masculino; 2 apresentaram perfil feminino e 7 não amplificaram.

Amostra 9FM ilustra a obtenção de perfil genético masculino único completo obtida para diversas amostras de vários espermatozoides (Figura 8).

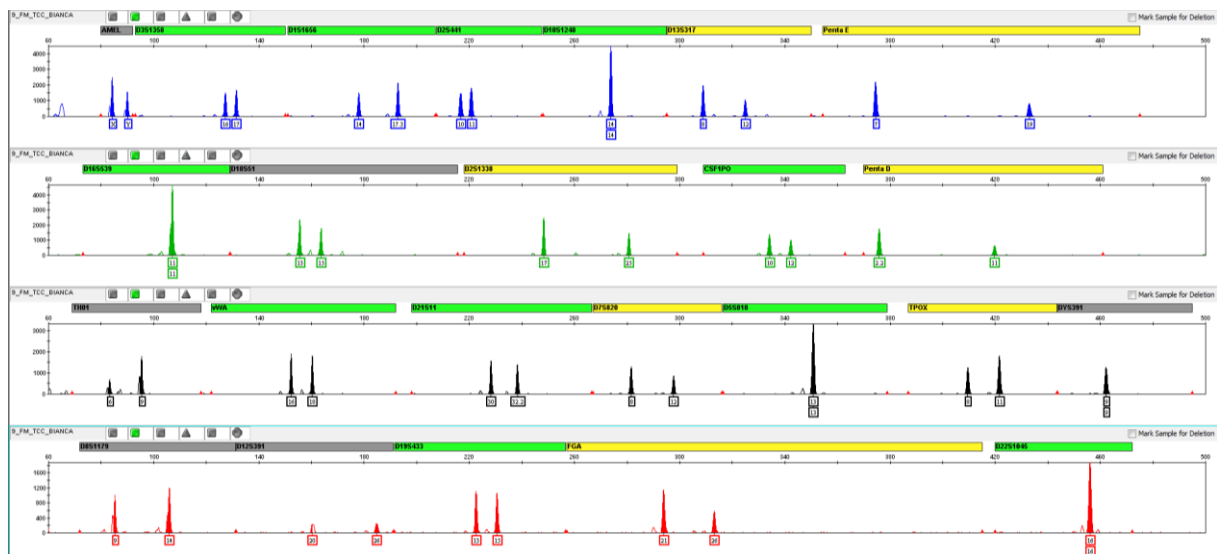


FIGURA 8. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO UM PERFIL ÚNICO MASCULINO COMPLETO OBTIDO DA AMOSTRA VÁRIOS 9FM. FONTE: A autora (2016).

A amostra 25FM de vários espermatozoides mostrou um resultado curioso, nesta, foi possível a identificação de uma mistura de pelo menos dois indivíduos do sexo masculino no controle interno do cromossomo Y DY5391 (Figura 9). Um resultado de importância, considerando que o material foi coletado de uma lâmina a fresco e que poderia ser resolvido com a utilização de *kit* específico para a amplificação de alelos STR do cromossomo Y.

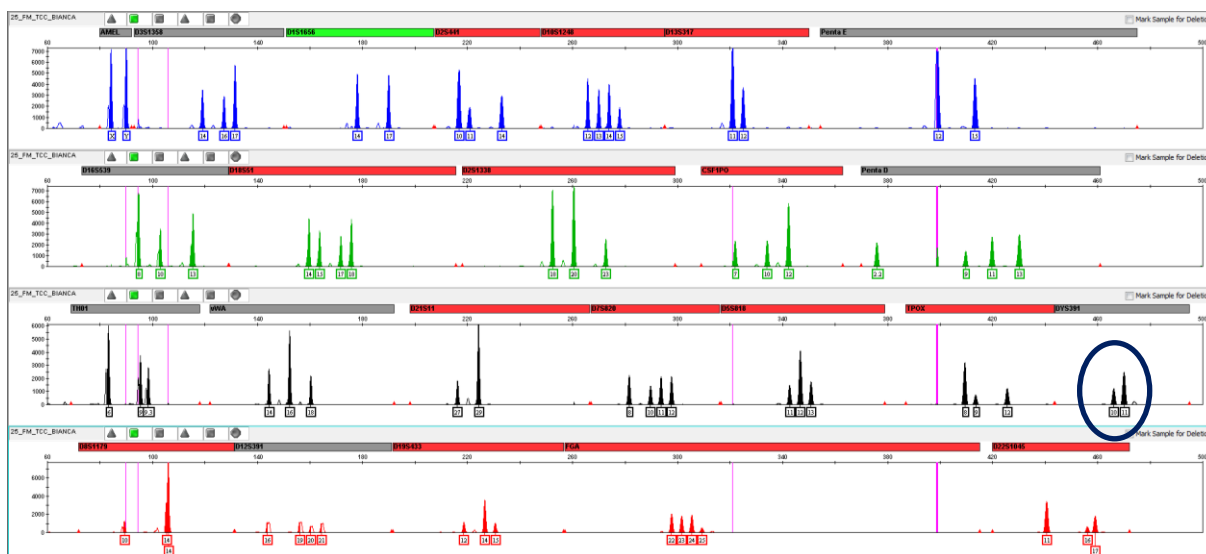


FIGURA 9. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO UM PERFIL DE MISTURA COM PELO MENOS DOIS INDIVÍDUOS DO SEXO MASCULINO OBTIDO DA AMOSTRA VÁRIOS 25FM. NO DESTAQUE, O CONTROLE INTERNO DY5391. FONTE: A autora (2016).

Amostras 38FM e FF, provenientes de um preservativo, indicaram a presença de cromossomo Y. A fração masculina apresentou um perfil de mistura. A fração feminina obteve elevada quantidade de DNA e não foi possível observar o perfil genético, porém também é uma mistura, pois apresenta cromossomo Y. Após diluição do extrato puro e nova amplificação, é provável que seja possível fazer a análise completa. Para este caso, é possível fazer a seguinte análise: a mistura da fração feminina pode ser de uma vítima do sexo masculino e um agressor do mesmo sexo; ou a mistura pode ser de uma vítima feminina e de um agressor masculino, pois o pico referente ao cromossomo X no marcador da amelogenina é alto, indicando alta quantidade deste cromossomo na mistura. Se este último for o caso, foi possível recuperar o perfil das células epiteliais de uma vítima em uma lâmina de um preservativo de um caso de estupro, algo de importância, já que o preservativo é utilizado pelo homem e apresenta muito material masculino, e a obtenção de perfil da vítima nesses casos é dificultada.

Para as frações femininas de vários espermatozoides que não amplificaram (4FF, 14FF e 45FF), todas foram classificadas como *underconcentration* para concentrações dos cromossomos STR pela quantificação (Anexo B). Para as frações masculinas (17FM, 19FM, 26FM, 32FM, 33FM, 36FM e 45FM) o mesmo ocorreu, e em uma delas (32FM) a classificação para concentrações do cromossomo Y foi *no target*, quando não há detecção de DNA na amostra. Da mesma forma que as amostras anteriores, onde não foi possível recuperar material masculino, estas amostras também podem ser submetidas à análise das regiões STR do cromossomo Y.

## 7. CONCLUSÃO

Tendo em vista que as lâminas utilizadas na realização de testes confirmatórios para a presença de espermatozoides atualmente são descartadas, e que podem apresentar quantidade de DNA suficiente para obtenção de perfil genético são de grande significado, principalmente nas amostras de raros e moderados espermatozoides, onde foi possível cumprir o objetivo de recuperar material genético masculino das amostras e recuperar perfis genéticos masculinos completos e parciais. Quando consideramos a dificuldade encontrada na recuperação de perfil dessas amostras atualmente no Laboratório de Genética Molecular Forense, os benefícios do novo método desenvolvido neste trabalho se tornam claros. O novo método de lavagem de lâminas de testes de pesquisa de espermatozoides, com eficiência aqui comprovada, ainda proporciona uma nova fonte de material que pode ser utilizado como contra prova para testes futuros nos casos de crimes sexuais. Os resultados aqui obtidos juntamente com as perspectivas futuras de análise das amostras pelo *kit* específico de determinação de alelos STR do cromossomo Y, que possivelmente permitirá a resolução do perfil de diversas amostras, apresenta grandes possibilidades para a futura aplicação na rotina forense.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLERY, J. P., et al., **Cytological detection of spermatozoa: Comparison of three staining methods.** *J Forensic Sci*, França, pp. 349–351, 2001.

**APPLIED BIOSYSTEMS.** 7500/7500 Fast Real-Time PCR System. 2010

**APPLIED BIOSYSTEMS.** Amp FISTR®Yfiler™ PCR Amplification Kit. 2006

BANCROFT, J.D., LAYTON, C., SUVARNA, S.K., **Bancroft's theory and practice of histological techniques.** 7ªedição, Reino Unido, Elsevier, pp. 175-176. 2013.

BOZZO, W.R., COLUSSI, A.G., ORTIZ, M.I., LOJO, M.M. **DNA recovery from different evidences in 300 cases of sexual assault.** *Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2*, Argentina, pp.141–142, 2009.

BUTLER, J. **Forensic DNA typing Biology, Technology, And Genetics of STR Markers.** 2ªedição, Estados Unidos da América, Elsevier, pp. 85-117, 2005.

BUTLER, J. **Fundamentals of Forensic DNA Typing.** Estados Unidos da América, Elsevier, pp. 105-106, 2010.

BUTLER, J. **Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology.** 2ªedição, Estados Unidos da América, Elsevier, pp. 49-67, 2012.

CHAPMAN, R.L., BROWN, N.M., KEATING, S.M. **The isolation of spermatozoa from sexual assault swabs using Proteinase K.** *J Forensic Sci*, Reino Unido, pp. 207-12, 1989.

CONNORS, E., LUNDREGAN, T., MILLER, N., MCEWEN, T. **Convicted by juries, exonerated by science: case studies in the use of DNA evidence to establish innocence after trial.** *Research Report*, Department of Justice, National Institute of Justice, Estados Unidos da América, 1996.

CROCE, D., JUNIOR, D.C. **Manual de medicina legal.** 8ª edição, Brasil, Saraiva, pp 1235-1236,2012

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, University of Arizona - The Biology Project, **What are the 13 core CODIS loci?** Arizona, 2000 Disponível em: <[http://www.biology.arizona.edu/human\\_bio/activities/blackett2/str\\_codis.html](http://www.biology.arizona.edu/human_bio/activities/blackett2/str_codis.html) > Acesso em Dez 2015.

GARVIN, A.M., FISCHER, A., SCHNEE-GRIESE, J., JELINSKI, A., BOTTINELLI, M., SOLDATI, G., TUBIO, M., CASTELLA, V., MONNEY, N., MALIKAND, N., MADRID, M., **Isolating DNA from sexual assault cases: a comparison of standard methods with a nuclease-based approach.** *Investigative Genetics*, França, pp. 1-10, 2012.

GILL, P., JEFFERYS, A.J., WERRETT, D.J. **Forensic application of DNA 'fingerprints'.** *Nature*, Estados Unidos da América, pp. 577-579, 1985.

GINGRAS, F., PAQUET, C., BAZINET, M., GRANGER, D., MARCOUX-LEGAULT, K., FIORILLOA, M., SÉGUIN, D., BALTZER, F., CHAMBERLAND, C., JOLICOEUR, C. **Biological and DNA evidence in 1000 sexual assault cases.** *Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2*, Canadá, pp. 138 –140, 2009.

GROCIN, C., SIBILLE, I., GRANDMAISON, G.L., BANASR, A., BRION, F., DURIGON, M. **Analysis of 418 cases of sexual assault.** *Forensic Science International*, França, pp 125-130, 2003.

JOBLING, M.A., GILL, P. **Encoded evidence: DNA in forensic analysis.** *Nature Reviews Genetics* Volume 5, Estados Unidos da América, p.739, 2004.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de ações programáticas estratégicas. **Prevenção e tratamento dos agravos resultantes da violência sexual contra mulheres e adolescentes: norma técnica 3.** ed. atual e 1. reimpr. Ministério da Saúde, Brasil, 2012.

PINHEIRO, M.F. **Genética e biologia forense, e criminalística.** In: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. In: NOÇÕES GERAIS SOBRE OUTRAS CIÊNCIAS FORENSES MEDICINA LEGAL, p. 57 2004.

**PROMEGA CORPORATION.** PowerPlex®16 HS system. 2015.

**PROMEGA CORPORATION.** PowerPlex® Fusion system. 2015.

**PROMEGA CORPORATION.** Plexor® HY system for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-time PCR Systems. 2013.

ROMERO-MONTOYA, MARTINEZ-RODRIGUEZ, H., PEREZ, M.A., ARGUELLO-GARCIA, R. **Relationship of spermatoscopy, prostatic acid phosphatase activity and prostate-specific antigen (p30) assays with further DNA typing in forensic samples from rape cases.** *Forensic Science International*, México, pp. 111–118, 2011.

SAWAYA, M. C. T., ROLIM, M.R.S. **Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório.** 1ª Edição, Brasil, Juruá, pp 55– 59, 2003

SECRETARIA DA SAÚDE DO PARANÁ. **Protocolo para o atendimento às pessoas em situação de violência sexual.** República Federativa do Brasil, 2015.

SECRETARIA DE SEGURANÇA PÚBLICA DO PARANÁ, Instituto médico Legal **POP-LQLSF-006-Pesquisa de sêmen em swabs**, República Federativa do Brasil, 2015.

SECRETARIA DE SEGURANÇA PÚBLICA DO PARANÁ, Instituto médico Legal **POP-LQLSF-007-Pesquisa de sêmen em manchas**, República Federativa do Brasil, 2015.

SIMONS, J.L., VINTINER, S.K. **Effects of histological staining on the analysis of human DNA from archived slides.** *J Forensic Sci*, Nova Zelândia, pp. 223-228, 2011.

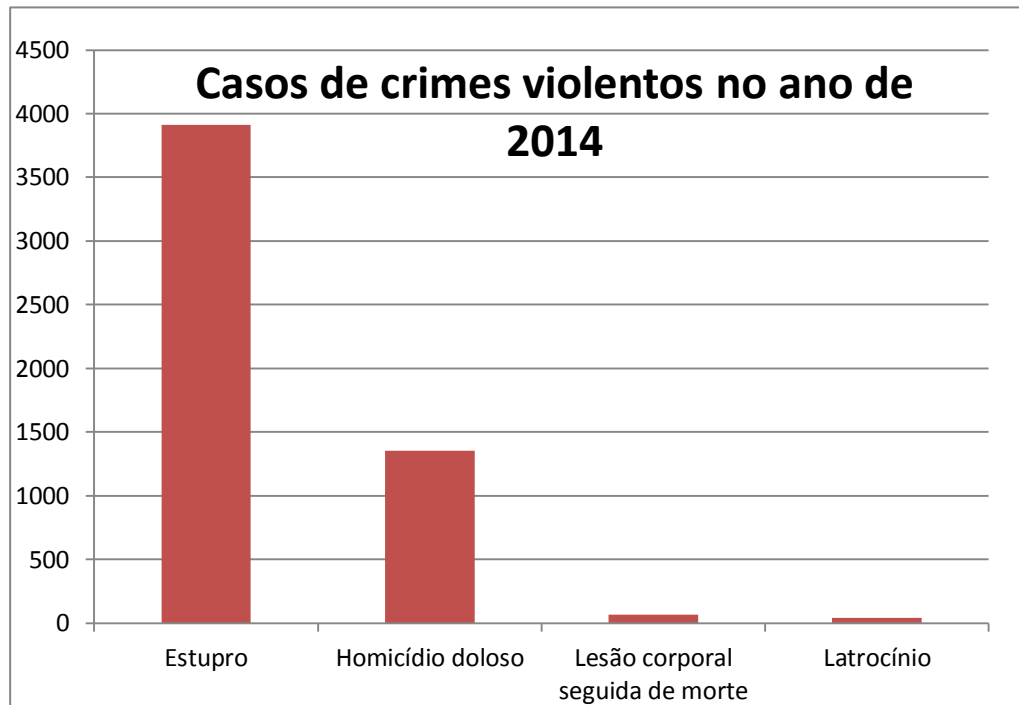
SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA PÚBLICA. **Estatísticas criminais**, República Federativa do Brasil, 2015.

VAN OORSCHOT, R.A.H., JONES, M.K. **DNA fingerprints from fingerprints.** *Nature*, ed.387, Austrália, p.767, 1997.



WIEGAND, P., SCHURENKAMP, M., SCHUTTE, U. **DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis.** *Int J Legal Med*, Alemanha, pp. 359– 360, 1992.

YOSHIDA, K., SEKIGUCHI, K., MIZUNO, N., KASAI, K., SAKAI, I., SATO, H., SETA, S. **The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen.** *Forensic Sci Int*, Japão, pp. 25–33, 1995.

**Anexo A – Crimes violentos no estado do Paraná**

Crimes violentos ocorridos no estado do Paraná no ano de 2014. Fonte: SINESP, 2014

**Anexo B – Resultados da quantificação e análise de tamanho dos fragmentos para as amostras de casos reais.**

Raros espermatozoides						
Amostras	DNA AUTOSSÔMICO		Perfil Genético	DNA do Y		Perfil Genético
	Quantidade (ng)	Status		Quantidade (ng)	Status	Presença cromos. Y
02FF	101,91056	Overconc.	PF	0,069978	Underconc.	N
02FM	1,0918747	Underconc.	PM	0,901253	Below Target	S
08FF	323,84705	Overconc.	PF	0,001351	Underconc.	N
08FM	3,9138415	Below Target	PF	0,001006	Underconc.	N
10FF	0,0006786	Underconc.	NA	N/A	No Target	N
10FM	0,181706	Underconc.	NA	N/A	No Target	N
12FF	0,1265041	Underconc.	PF - PL	0,001942	Underconc.	N
12FM	0,0190651	Underconc.	NA	0,008132	Underconc.	N
15FF	44,738969	Overconc.	PF	0,015061	Underconc.	N
15FM	0,1600248	Underconc.	PF	0,065167	Underconc.	N
34FF	0,3261003	Underconc.	PF - PL	N/A	No Target	N

34FM	0,0077304	Underconc.	NA	N/A	No Target	N
46FF	0,0022685	Underconc.	NA	N/A	No Target	N
46FM	0,0017938	Underconc.	NA	N/A	No Target	N
51FF	7,0490018	Overconc.	PF	0,003985	Underconc.	N
51FM	0,0057178	Underconc.	NA	0,001896	Underconc.	N
53FF	36,1397	Overconc.	PM	29,86499	Overconc.	S
53FM	0,77947	Underconc.	PM	0,730006	Below Target	S
56FF	70,4129	Overconc.	PF	0,008526	Underconc.	N
56FM	3,878165	Below Target	PF	0,08868	Underconc.	S
57FF	0,394467	Underconc.	NA	0,019657	Underconc.	N
57FM	0,0336	Underconc.	NA	0,047651	Underconc.	S
<b>Moderados espermatozoides</b>						
<b>Amostras</b>	<b>DNA AUTOSSÔMICO</b>		<b>Perfil Genético</b>	<b>DNA do Y</b>		<b>Perfil Genético</b>
	<b>Quantidade (ng)</b>	<b>Status</b>		<b>Quantidade (ng)</b>	<b>Status</b>	<b>Presença cromos. Y</b>
07FF	20,186965	Overconc.	PF	0,00933	Underconc.	N
07FM	0,1526075	Underconc.	M	0,106281	Underconc.	N
11FF	0,13967	Underconc.	PF – PML	N/A	No Target	N

11FM	0,0626152	Underconc.	PM - PML	0,068675	Underconc.	S
20FF	2,156092	Underconc.	PM	1,235591	In Range	S
20FM	0,3274632	Underconc.	PM	0,194693	Underconc.	S
22FF	2,9587322	Below Target	PF	N/A	No Target	N
22FM	0,0735003	Underconc.	NA	0,005707	Underconc.	N
24FF	168,28726	Overconc.	PF	0,003897	Underconc.	N
24FM	0,0945252	Underconc.	PM - PML	0,010621	Underconc.	S
27FF	0,4192025	Underconc.	PF	0,004998	Underconc.	N
27FM	0,0204077	Underconc.	PM - PML	0,043419	Underconc.	S
31FF	7,26272	Overconc.	PF	N/A	No Target	N
31FM	0,0096804	Underconc.	NA	0,006931	Underconc.	N
35FF	172,98507	Overconc.	PF	N/A	No Target	N
35FM	0,9909845	Underconc.	NA	N/A	No Target	N
40FF	16,793645	Overconc.	PF	N/A	No Target	N
40FM	0,0757873	Underconc.	PM - PML	0,002185	Underconc.	S
41FF	4,8340397	Below Target	PF	N/A	No Target	N
41FM	0,024016	Underconc.	NA	0,00669	Underconc.	N

43FF	37,742135	Overconc.	PF	0,003163	Underconc.	N
43FM	0,0111776	Underconc.	NA	0,006678	Underconc.	N
49FF	0,2873217	Underconc.	NA	0,174377	Underconc.	S
49FM	0,0398387	Underconc.	PF - PML	0,0796	Underconc.	N
52FF	0,0714086	Underconc.	NA	0,055859	Underconc.	S
52FM	0,0554932	Underconc.	NA	0,033531	Underconc.	N
54FF	65,05475	Overconc.	PF	0,005331	Underconc.	N
54FM	0,259093	Underconc.	M	0,00591	Underconc.	S
55FM	2,135676	Underconc.	M	0,723483	Below Target	S
59FF	32,27407	Overconc.	PF	0,003799	Underconc.	N
59FM	0,279103	Underconc.	M	0,052588	Underconc.	S
<b>Vários espermatozoides</b>						
<b>Amostras</b>	<b>DNA AUTOSSÔMICO</b>		<b>Perfil Genético</b>	<b>DNA do Y</b>		<b>Perfil Genético</b>
	<b>Quantidade (ng)</b>	<b>Status</b>		<b>Quantidade (ng)</b>	<b>Status</b>	<b>Presença cromos. Y</b>
01FF	83,788638	Overconc.	PF	0,013895	Underconc.	N
01FM	0,1918266	Underconc.	PM - PPA	0,260673	Below Target	S
03FF	148,33235	Overconc.	PF	0,302504	Below Target	N

03FM	5,0274659	Overconc.	PM	8,631788	In Range	S
04FF	0,1530223	Underconc.	NA	0,031896	Underconc.	N
04FM	1,0746606	Underconc.	PM	0,736811	Below Target	S
05FF	0,6308083	Underconc.	PF	N/A	No Target	N
05FM	0,1206331	Underconc.	PM - PL	0,106405	Underconc.	S
06FF	56,550242	Overconc.	PF	0,033688	Underconc.	N
06FM	3,5104037	Below Target	M	1,502866	In Range	S
09FF	26,451629	Overconc.	PF	0,015761	Underconc.	N
09FM	1,0568523	Underconc.	PM	2,212773	In Range	S
13FF	29,769238	Overconc.	PF	3,959803	In Range	N
13FM	38,039635	Overconc.	PM	49,42711	Overconc.	S
14FF	0,7107284	Underconc.	NA	0,348663	Below Target	N
14FM	0,0652722	Underconc.	PM - PML	0,051984	Underconc.	S
16FF	6,6404861	Overconc.	M	1,926737	In Range	S
16FM	0,3641224	Underconc.	PM	0,101708	Underconc.	S
17FF	0,5615267	Underconc.	PF	0,001865	Underconc.	N
17FM	0,0513215	Underconc.	NA	0,032451	Underconc.	S

18FF	12,275626	Overconc.	PF	0,004856	Underconc.	N
18FM	0,0766469	Underconc.	PF - PL	0,071389	Underconc.	N
19FF	0,6004845	Underconc.	PM - PL	0,387912	Below Target	S
19FM	0,0785854	Underconc.	NA	0,018179	Underconc.	N
21FF	107,04773	Overconc.	PF	0,515065	Below Target	N
21FM	1,5522244	Underconc.	PM	1,957356	In Range	S
23FF	0,1567396	Underconc.	M	0,267571	Below Target	S
23FM	1,2425085	Underconc.	PM	1,370028	In Range	S
25FF	12,837302	Overconc.	M	1,498745	In Range	N
25FM	1,7264708	Underconc.	M	2,332082	In Range	S
26FF	17,911631	Overconc.	PF	0,002515	Underconc.	N
26FM	0,0125907	Underconc.	NA	0,008407	Underconc.	N
28FF	3,9661775	Below Target	M	0,380799	Below Target	S
28FM	0,9410023	Underconc.	PM	1,285638	In Range	S
29FF	253,51238	Overconc.	PF	0,059725	Underconc.	N
29FM	1,1691124	Underconc.	PM	0,813674	Below Target	S
30FF	29,507425	Overconc.	PF	0,184226	Underconc.	N



30FM	0,1847716	Underconc.	PM	0,222863	Below Target	S
32FF	1,0884589	Underconc.	PF	N/A	No Target	N
32FM	0,0150477	Underconc.	NA	N/A	No Target	N
33FF	2,8564633	Below Target	PF	N/A	No Target	N
33FM	0,0260867	Underconc.	NA	0,016973	Underconc.	N
36FF	2,737665	Below Target	PF	N/A	No Target	N
36FM	0,0045457	Underconc.	NA	0,001058	Underconc.	N
37FF	14,02416	Overconc.	PF	0,008443	Underconc.	N
37FM	0,4142682	Underconc.	M	0,175715	Underconc.	S
38FF	68,593301	Overconc.	M	1,923111	In Range	S
38FM	3,6977655	Below Target	PM - PL	0,372261	Below Target	S
39FF	27,15537	Overconc.	PF	0,001639	Underconc.	N
39FM	0,0977974	Underconc.	PF-PL	0,074133	Underconc.	N
42FF	14,160415	Overconc.	PF	0,009087	Underconc.	N
42FM	0,137665	Underconc.	PM - PML	0,236849	Below Target	S
44FF	66,704627	Overconc.	PF	0,087963	Underconc.	N
44FM	0,2335983	Underconc.	PM	0,464678	Below Target	S

45FF	0,1014109	Underconc.	NA	N/A	No Target	N
45FM	0,0269635	Underconc.	NA	0,029319	Underconc.	N
47FF	4,3342568	Below Target	PF	0,03085	Underconc.	N
47FM	0,099186	Underconc.	PM – PL	0,263182	Below Target	S
48FF	8,4881587	Overconc.	M	1,704291	In Range	S
48FM	19,376124	Overconc.	PM	22,64318	Overconc.	S
50FF	37,250564	Overconc.	PF	0,091972	Underconc.	N
50FM	0,7340968	Underconc.	PM	1,364593	In Range	S